

PREPARATION OF HIGHLY CONDUCTIVE HEME PROTEIN SOLID FILM

Patent Number: JP3045632

Publication date: 1991-02-27

Inventor(s): NAKAHARA SUKENORI; others: 03

Applicant(s): AJINOMOTO CO INC

Requested Patent: JP3045632

Application Number: JP19890181488 19890713

Priority Number(s):

IPC Classification: C08J5/18; C07K3/00; C07K15/22; C12N11/14;
H01B1/12

EC Classification:

Equivalents:

-

Abstract

PURPOSE: To improve the reduction rate and electric conductivity by reducing with a reducing agent a heme protein soln. which has been deoxygenated and purged by an inert gas, introducing the soln. into a solid film-forming cell, and evaporating the solvent in a vacuum.

CONSTITUTION: After a heme protein soln. is deoxygenated and purged by an inert gas, a reducing agent is added to the soln. to reduce the heme protein. The reduced soln. is then introduced into a solid film-forming cell which has an electrode-equipped substrate material and which has previously been purged by an inert gas. Then the solvent of the soln. is evaporated in a vacuum to give a solid film having a reducing rate of the heme protein of 95% or higher and an electric conductivity of 10^{-5} S/cm or higher.

Data supplied from the esp@cenet database - 12

⑫ 公開特許公報(A) 平3-45632

⑤Int.Cl.³ 識別記号 庁内整理番号 ④公開 平成3年(1991)2月27日
 C 08 J 5/18 CF J 8517-4F
 C 07 K 3/00
 15/22 8619-4H
 C 12 N 11/14 2121-4B
 H 01 B 1/12 7244-5G
 // C 08 H 1/00 NVD Z 8215-4J
 C 08 L 89:00

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全7頁)

④発明の名称 高伝導性ヘム蛋白質固体膜の製造方法

①特 願 平1-181488

②出 願 平1(1989)7月13日

⑦発明者 中原 祐典 宮崎県都城市早水町7-2-17
 ⑦発明者 井口 洋夫 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中39
 ⑦発明者 木村 啓作 愛知県岡崎市龍美南2-2-1
 ⑦発明者 高橋 三雄 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央
 研究所内
 ⑦出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

明 細 書

1. 発明の名称

高伝導性ヘム蛋白質固体膜の製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) 脱酸素、不活性ガス置換したヘム蛋白質溶液に還元剤を加えてヘム蛋白質を還元し、予め不活性ガスで置換した固体膜調製セルに該溶液を導入した後、溶媒を真空蒸発させることを特徴とする該セル中の電極具備基材表面での高還元、高電気伝導性ヘム蛋白質固体膜の製造方法。

(2) ヘム蛋白質の還元率が95%以上で、電気伝導度が $10^{-5} \text{ S cm}^{-1}$ 以上である特許請求項(1)記載の高伝導性ヘム蛋白質固体膜の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、高い還元率をもち、かつ高電気伝導性のヘム蛋白質固体膜の製造方法に関する。

〔従来の技術〕

ヘム蛋白質は活性中心にヘムを持ち生体内の機能としては大別すれば、電子の受渡しをする(チ

トクローム類)、酸素を可逆的に結合する(ヘモグロビンやミオグロビン等)、酸素の添加反応を触媒する(ナトクロームP450等)、 H_2O_2 と反応する(カタラーゼやペルオキシダーゼ等)がある。例えば電子授受を行うナトクローム類はヘムの中心にある鉄原子の2価と3価の状態の遷移により酸化還元を行う。

従来、これらのヘム蛋白質の固体膜はヘム中心の鉄原子を還元することにより電気伝導度が上昇することが知られている。

例えばナトクローム e_3 の場合、 H_2 分子を酸化する酵素ヒドロゲナーゼの存在下次の反応



が起こりナトクローム e_3 は還元される。これまでこの反応を利用してナトクローム e_3 の固体膜の高還元体が得られ高伝導性を示すことが知られている。(参考文献1)しかしながらこの方法ではナトクローム e_3 と特異的に反応するヒドロゲナーゼの存在が不可欠である。また他のヘム蛋白質につ

いても固体膜の還元体の作製が行われているが還元状態のヘムは容易に酸化されやすく高い還元率を得ることは可能でなく従って高い伝導性の固体膜を得ることはできなかった。

(参考文献 1. Y. Nakahara, K. Kimura, H. Inokuchi & T. Yagi, Chem. Lett. 877 (1979))

〔発明が解決しようとする課題〕

本発明は、上記の問題点に鑑みてなされたもので、高い還元率をもち、その結果高い電気伝導性をもつヘム蛋白質固体膜の製造方法を提供することを課題とする。

〔課題を解決するための手段〕

前述の課題を達成するため、本発明者らは高伝導性ヘム蛋白質固体膜の製造方法を開発した。すなわち本発明は脱酸素、不活性ガス置換したヘム蛋白質溶液に還元剤を加えてヘム蛋白質を還元し、予め不活性ガスで置換した固体膜調製セルに該溶液を導入した後、溶液を真空蒸発させることを特徴とする該セル中の電極具備基材表面での高還元、高電気伝導性ヘム蛋白質固体膜の製造方法である。

ラムにより還元剤を除去する必要がある。

不活性ガスとしては、通常 N_2 、 Ar 、 He のいずれか、あるいは還元性の H_2 を用いる。基材の上に形成されるヘム蛋白質固体膜はヘム蛋白質溶液の濃度、キャストの速度により、 $10\text{ nm} \sim 100\text{ }\mu\text{m}$ の範囲で制御することができる。

以下本発明の実施例を図面を参照して具体的に説明する。

〔実施例〕

第1図はヘム蛋白質固体膜の調製装置全体を示し、第2図は同上装置の固体膜調製セルEの拡大図を示す。ヘム蛋白質固体膜の調製装置は、液体窒素トラップを備えた真空系1、セファデックス・カラム系2、固体膜調製系3及び不活性ガス(N_2 、 Ar 、 He のいずれかまたは H_2) の供給系4とからなる。

真空系1は、ロータリポンプa、液体窒素(LN₂)トラップb、水銀マノメータc、真空バルブdお

これにより還元率95%以上の高い還元率をもち、その結果 10^{-5} S cm^{-1} 以上の高電気伝導性をもつヘム蛋白質固体膜を製造することができる。

本発明においてヘム蛋白質としてチトクローム類では馬、豚、羊、犬、鳩、鶏、まぐろ等の生体の心筋由来のチトクロームcを好適に用いることができる。また他のヘム蛋白質についてもヘモグロビン等市販品より入手できる。また還元剤としては、一般に水素化合物(H_2 , $LiAlH_4$ 等)、通常より低い原子価をもつ元素の酸化物や塩(CO 、亜硫酸塩等)、低原子価金属イオンを含む塩($K_2[Fe(CN)_6]$ 等)、硫黄化合物(硫化ナトリウム等)や酸、シュウ酸、アルデヒドのような有機酸があるが、 $Na_2S_2O_4$ 、 $NaBH_4$ 、 $LiBH_4$ やアスコルビン酸を好適に用いることができる。

ヘム蛋白質溶液に添加する還元剤の量は、ヘム蛋白質の1~100モル倍、とくに2~10モル倍が好ましい。

還元剤の固体膜への混入が伝導性に影響を与える場合は後述の実施例のようにセファデックス・カ

よびリークバルブeから成る。

また、セファデックス・カラムの脱酸素化系2は、高純度蒸留水槽A、セファデックス・カラムB、試料調製セルCおよび蒸留水注入口Dから成る。なお、 $U_1 \sim U_7$ 、 $V_1 \sim V_5$ はそれぞれバルブを示す。

薄膜調製系3は、電極gをもつ薄膜調製用ガラスセルE、薄膜調製用石英基板Gおよび該基板Gを吊り吊り上げノブFなどから成る。第2図に示すように、ガラスセルEには、バルブ V_4 を介してセファデックス・カラムBからチトクローム水溶液(h)を注入するパイプ(SUS-304、2mmφ)が中まで通じている。また、バルブ U_6 によって真空系に連絡している。

次に、セファデックス・カラムの脱酸素化、還元形チトクロームc水溶液の調製および薄膜調製について説明する。

脱酸素化

バルブ V_1 を開き蒸留水注入口(D)から水槽(A)に高純度蒸留水を注水しバルブ V_1 を閉じる。その後バ

ルパ U_1 を開き真空系によって蒸留水中の空気を脱気する。脱気終了後バルブ U_1 を閉じバルブ U_2 を開きガスシリンダーより N_2 ガス(Arガス)を導入する。10分間以上そのままにし再びバルブ U_2 を開き水槽(A)を脱気する。この操作を数回繰返し水槽(A)を完全に N_2 ガスの雰囲気に変換する。次にバルブ V_2 , V_3 を開きセファディクス・カラム(G-50)を充填し水槽(A)の N_2 ガス(Arガス)を含む高純度水を数時間流しセファディクス・カラムの中を N_2 ガス雰囲気とする。

還元形チトクローム・水溶液の調製

高純度蒸留水10ccに対して市販のチトクローム・数グラムの割合で解かした水溶液と若干量の還元剤 $Na_2S_2O_4$ を準備し、第3図に示すように真空系と連結できる真空コック付きガラス容器Hにそれぞれ別々の箇所を導入し、次に述べる手順に従って還元形チトクローム・溶液の調製を行った。

まず最初に真空コックを閉かに開きチトクローム・溶液中のガスを真空系を通じ脱気する。

薄膜調製用ガラスセルEにバルブ V_4 を開き導入する。このときバルブ V_5 は閉じている。導入が終了したら、バルブ V_4 を閉じてバルブ V_3 を開き、次に排出される $Na_2S_2O_4$ を溶液とする。

なお、還元形チトクローム・溶液と $Na_2S_2O_4$ 溶液の分離は導電率計で測定され記録計にモニタリングされる。

薄膜調製

バルブ U_4 , U_5 を開き、さらにバルブ U_6 を閉かに開き薄膜調製用ガラスセルEの中の還元形チトクローム・溶液の窒素ガスを突沸しないように注意し脱気した。

脱気が終了した時点でセルEの中に吊るされた石英基板Qを適当に溶液の中に下ろす。水溶液中の水分子は表面から蒸発し液体窒素トラップに捕えられる。水分子の蒸発に従ってガラス管セルEの内壁と石英基板Qの上にはチトクローム・の膜が合成される。

なお、膜厚の測定は表面粗さ計(Dektak roughness tester)、干渉顕微鏡法(Sloan's interference

充分な脱気がなされた後、コックを閉じ還元剤 $Na_2S_2O_4$ とチトクローム・溶液を混合した。溶液が赤褐色(酸化形)から透明なピンク(還元形)に変わったのを確かめ還元形の判定を行った。酸化形と還元形の定量的判別は分光実験によるスペクトルの形から決める。

この還元されたチトクローム・溶液から還元剤 $Na_2S_2O_4$ を取り除くために脱膜素され窒素ガス置換されたセファディクス・カラムBの上部第1図の試料調製セルCのところに取付けた。

この溶液をセファディクス・カラム注入口のバルブ V_5 を開きカラムBに導入し終わったらバルブ V_5 を閉じ、バルブ V_2 を開き窒素置換された蒸留水を流す。このときカラムの下部の排出口のバルブ V_4 は閉じ、バルブ V_3 は開いている。

相当時間の後、セファディクス・カラムB(Sephadex G-50)を通過した溶液からは始めに還元形チトクローム・溶液が排出され、次に還元剤 $Na_2S_2O_4$ が排出される。始めに排出される還元形チトクローム・溶液を予め窒素ガス置換された

microscope M-100)、BとQバンドの吸収強度の測定による3種の方法で行った。

石英基板Q(電極付)への薄膜調製の場合は膜合成終了後、石英基板Qは直ちに薄膜調製用装置から取りだされ電気伝導度測定装置または光学測定装置に取付ける。薄膜はその装置の中で真空系によって約1時間以上真空曳きされ充分な乾燥を行ない、その後、 N_2 ガス、 H_2 ガス、Arガスのいずれかを導入し、物性測定に移る。

薄膜調製用セルEのガラス管(電極付)壁への薄膜調製の場合は溶液がなくなるまで真空系で曳き膜を作る。つづいて薄膜が乾燥するまでの約1時間を真空系で曳き続ける。その後、 N_2 ガス、 H_2 ガス、またはArガスのいずれかを導入し、物性測定に移る。

なお、酸化形チトクローム・溶液及び薄膜の調製は上記還元剤 $Na_2S_2O_4$ を酸化剤 $K_3Fe(CN)_6$ に置き換えて上記と同様な実験手順に従えばよい。

次に、電気伝導度および還元率と光学吸収スペクトルについて説明する。

電気伝導度の測定結果

この項では直流測定について述べる。使用されたチトクローム。の薄膜試料は底1 (第4図 - [1])と底2 (第4図 - [2])である。いずれの試料も光学吸収スペクトルで調べた還元率は95%以上で大小を区別できないが伝導度でみると底1の方が底2よりも高い。還元形チトクローム。の電気伝導度の温度依存性を第4図に示した。

試料底1の電気伝導度は300K付近で最大値を取りそれ以上の温度では温度の上昇とともに減少する。300K以下の温度領域における活性化エネルギー、 E_a 、を求めると0.6 eVとなる。この値は以前に得られた値と一致している。測定されたコンダクタンス G を伝導度 σ に換算するとおおよそ次のようになる

$$\sigma = G \times 10^4 [\text{S/m}] = G \times 10^4 [\text{S/cm}]$$

これより伝導度の最大値を求めると300K付近で約 10^{-1} S/cm であり、抵抗率にすると約 $10 \Omega \cdot \text{cm}$ である。

試料底2は電気伝導度に換算するとおおよそ次のようにおける。

ピーク値は405 nmにあり溶液の410 nmとは5 nmだけずれている。このずれが溶液と薄膜のスペクトルの違いの特徴であるがその原因についてはまだ充分にわかっていない。還元形スペクトルの還元率は後で示されるように約90%であり完全な還元形ではない。また酸化形スペクトルの還元率はほぼ0に等しく完全酸化形に近い。

また別の薄膜試料 (sample 底4) について還元形から酸化形への移行過程のスペクトルと同時に電気伝導度も測定した。

これらのスペクトルのデータより吸収強度比 A_T/A_A , $A_A/A_A(0)$ が求められ、これらの曲線の還元率 $[N(O)/N(O)+N(0)]$ が検討される。さらに還元率と伝導度との間の関係も求められる。その検討結果を表1に示した。(薄膜底4 (a), (b), (c))

その結果、 α ピークは還元率によらず一定位置にあり、そのピーク値は還元率に依存している。 α ピーク値と還元率の関係は一般に比例するものとして取り扱うことができる。ある試料の A_A と $A_A(0)$ の比、すなわち $A_A/A_A(0)$ を縦軸に取り、還元率

$$\sigma = G \times 10^7 [\text{S/m}] = G \times 10^5 [\text{S/cm}]$$

底2の抵抗率の最大値は290 K付近で約 $100 \Omega \cdot \text{cm}$ である。この試料の活性化エネルギーは大きい値である。以上二つの試料の伝導度の違いは還元率の違いによるものと思われる。

還元率と光学吸収スペクトル

チトクローム。還元形溶液の光学吸収スペクトルを第5図に示した。還元は $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ で行われた。 α , β , γ のピーク位置は550 nm, 520 nm, 415 nmであり、従来のよく知られたスペクトル曲線と一致している。次に、チトクローム。薄膜の吸収スペクトルの結果について述べる。

第6図の還元形スペクトルは上記の還元形溶液から還元剤 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を取り除いて作られた薄膜 (sample 底3) のスペクトルである。同じく、酸化形スペクトルは還元形のを数日間空气中に放置し酸化させたもののスペクトルである。還元形スペクトルの α , β , γ のピーク位置および酸化形スペクトルの525 nmのピーク位置は溶液系のそれと同じであるが、酸化形スペクトルの γ ピ

を横軸に取る。第5図の溶液のスペクトルを完全還元形 (還元率1.0)、完全酸化形 (還元率0.0) として溶液の $A_A(N)/A_A(O)$ と $A_A(O)/A_A(O)$ の値を求めると2.8と1.0である。この2点をプロットし結んだ直線を第7図に示した。他の薄膜試料の α ピーク比: $A_A/A_A(O)$ を求めプロットすると還元率が求まる。このようにして求めた試料底4の(a), (b), (c)の還元率はそれぞれ80%, 30%, 10%となる(前記したサンプル底3の還元率90%もこれによって求められた)。還元率95%以上または5%以下の両端の範囲において吸収スペクトルの差はほとんど変わらずこの範囲での吸収スペクトルによる還元率の判別は不可能である。

多くの薄膜試料から得られた電気伝導度と還元率の関係を表1にまとめ、第8図にプロットした。還元率95%以上で伝導度は急激に増加し異常性を示す。

表 1

試 料	$A_T/A\alpha$	$A\alpha/A\alpha(O)$	$NR/N(OH+NR)$	$\log \sigma(S/m)$
溶液 red.	5.2	2.8	>0.95	
oxi.	12.5	1.0	<0.05	
薄膜 red. (底3)	5.6	2.6	0.90	
oxi.	12.5	1.0	0.00	
薄膜 (a)	5.7	2.4	0.80	-8.24
(b)	8.8	1.5	0.30	-8.81
(c)	10.1	1.2	0.10	-10.1
film 底2	5.2	2.8	>0.95	-1
film 底1	5.2	2.8	0.95	1

$A\alpha$ と A_T は、それぞれチトクロームcの α および r -ピークの吸収である。 $A\alpha(O)$ は酸化形チトクロームcの α ピーク、 NR と $N(O)$ はそれぞれ還元形と酸化形チトクロームのモル数である。

σ は294°Kでのチトクローム薄膜の電気伝導度である。

の、又(3)及び〔3〕は試料底3の薄膜及び水溶液のプロットを各々表す。

第8図はチトクロームcの還元率と電気伝導度との関係を示すグラフである。

第1図～第3図中Bはセファデックス・カラム、Cは試材調製セル、Eは薄膜調製用ガラスセル、Gは石英基板を示す。

特許出願人味の素株式会社

〔発明の効果〕

以上説明したように、本発明によれば95%以上の高還元率をもち、その結果高い電気伝導を有するヘム蛋白質固体膜を作製することができる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明を実施するためのヘム蛋白質固体膜の調製装置の説明図。

第2図は第1図の薄膜調製セルEの拡大詳細図。

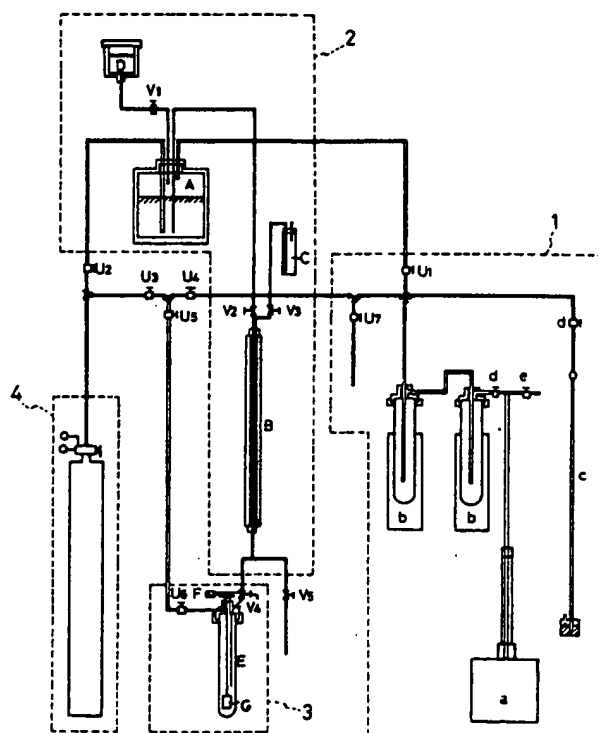
第3図は第1図の試料調製セルCの拡大詳細図。

第4図は本発明の実施に係るチトクロームc薄膜(底1、底2)についての電気伝導度の温度依存性を示すグラフ。

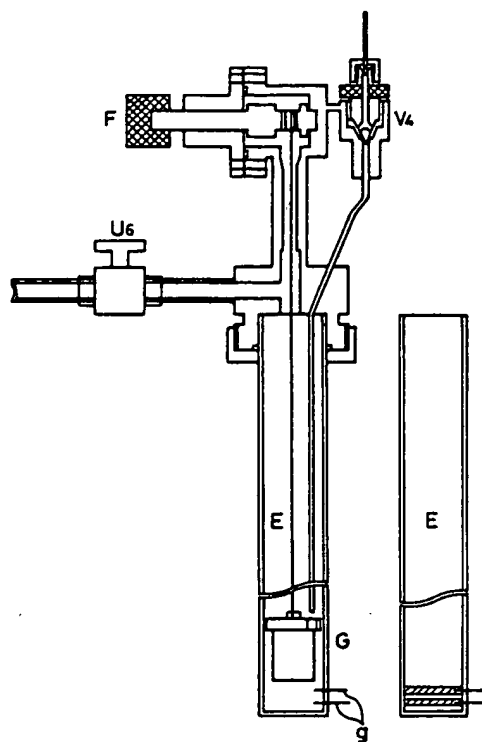
第5図は還元形チトクロームc水溶液の吸収スペクトルを示す分光特性図。

第6図は本発明の他の実施に係るチトクロームc薄膜(底3)の還元形および酸化形での吸収スペクトルを示す分光特性図。

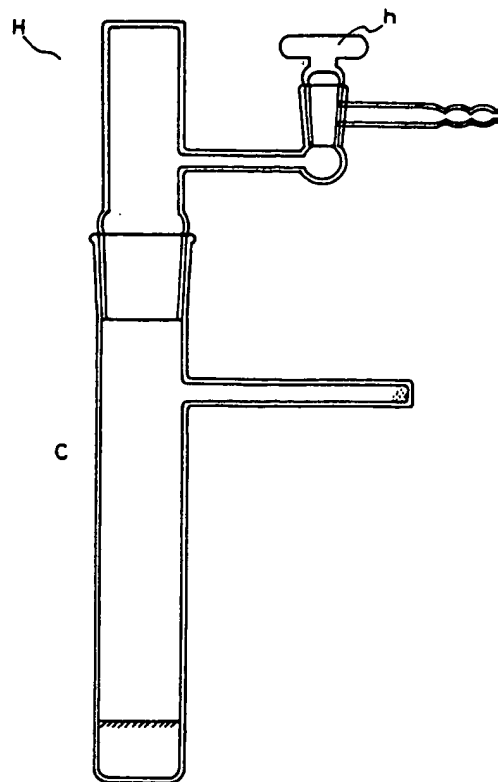
第7図は第8図および第9図のチトクロームc薄膜についての還元率と $A\alpha/A\alpha(O)$ との関係を示すグラフであって、図中、(a)、(b)および(c)は試料底4



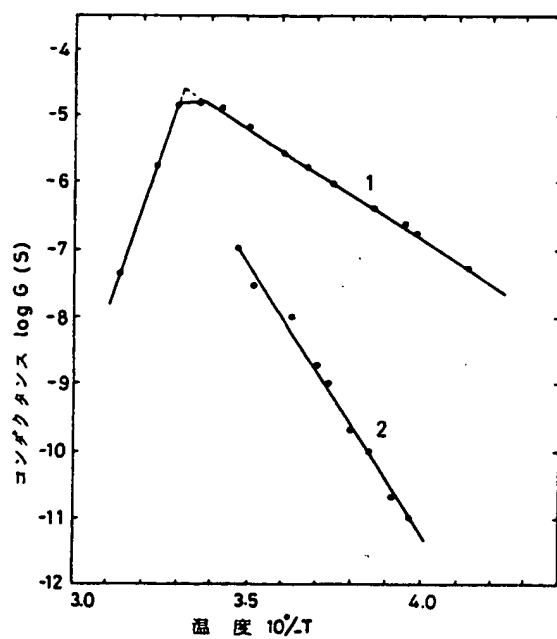
第 1 図



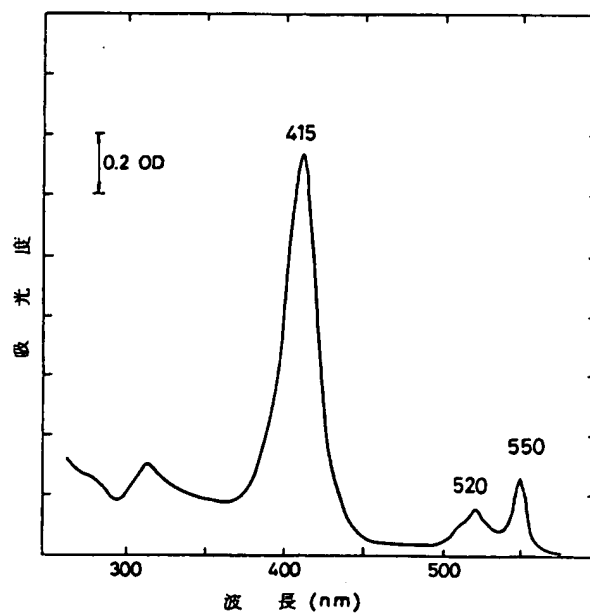
第 2 図



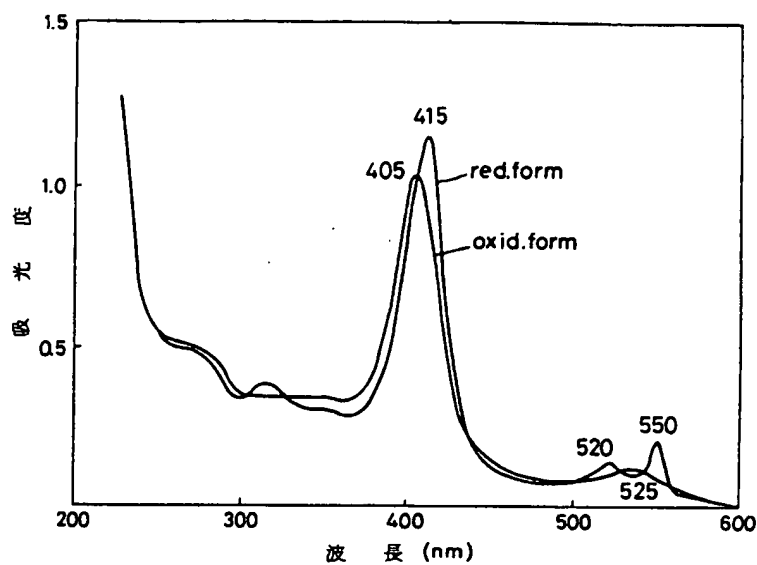
第 3 図



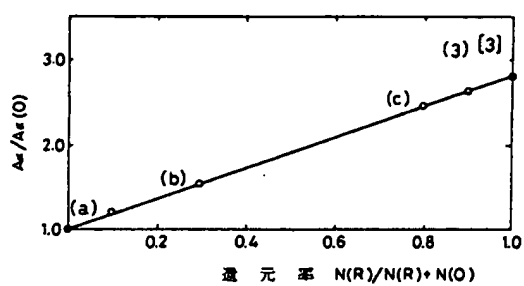
第 4 図



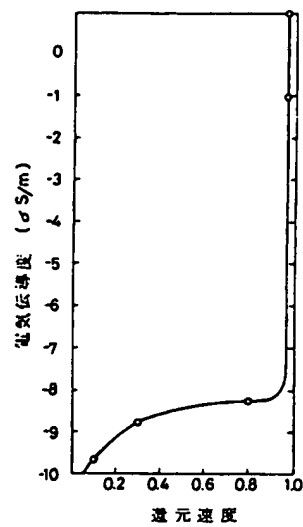
第 5 図



第 6 図



第 7 図



第 8 図